

**Der Nachweis von E 605 sowie anderen
cholinesterasehemmenden Insektiziden
und Arzneimitteln mit dem Blutegel**

(Auszug)

Inaugural-Dissertation
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen 1959
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Ruth Straller
aus Nürnberg

Verlag Chemie G. m. b. H., Weinheim / Bergstraße
1959

~~1956~~ № 219

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1957

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Th. Schneider

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. Dann

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. G. Hesse

Sonderdruck aus
Archiv der Pharmazie

292./64. Band, Heft 12, Seite 723—731

Verlag Chemie, GmbH, Weinheim / Bergstr.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1808. O. Dann und R. Straller

Über den Nachweis von cholinesterasenhemmenden Insektiziden und Arzneimitteln mit dem medizinischen Blutegel

(Acetylcholin V *)

Aus dem Institut für angewandte Chemie der Universität Erlangen

(Eingegangen am 27. Mai 1959)

Der Rückenmuskel des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis* L.) wurde von *H. Fühner*¹⁾ als Muskelpreparat eingeführt. Er entdeckte, daß der isolierte Blutegelrückenmuskel bei einem Aufenthalt von 10 Min. in einer Badflüssigkeit mit 400 γ Acetylcholin/40 ccm in der Regel sich noch nicht kontrahiert, daß aber dasselbe Muskelpreparat sich deutlich kontrahiert, wenn es zunächst 20 Min. lang in einer Badflüssigkeit mit nur 0,1 γ Eserin (Physostigmin)/40 ccm bleibt und dann erst in das Bad mit 400 γ Acetylcholin/40 ccm getaucht wird. Diese ausgeprägte Potenzierung der Acetylcholincontraktion des Blutegelrückenmuskels durch Eserin, diese Sensibilisierung, hat *H. Fühner*²⁾ zum toxikologischen Nachweis von Eserin ausgebaut, wobei er die andersartige Kontraktion durch Nikotin³⁾ und die weniger empfindliche durch einige weitere Alkaloide⁴⁾ beobachtete⁵⁾. Später wurde der Synergismus von Acetylcholin und Eserin zum Nachweis von Mengen ab 0,05 γ Acetylcholin mit dem Blutegelrückenmuskel erprobt⁶⁾ 7). *O. Loewi*⁸⁾ deutete diesen Synergismus richtig als Hemmung einer fermentativen Hydrolyse des Acetylcholins durch Eserin, bevor das Ehepaar *Stedman*⁹⁾ im Institut von *G. Barger* das Vorkommen einer derartigen Esterase im Pferdeserum nachwies. Diese Cholinesterase wurde nicht nur durch Eserin stark gehemmt, sondern auch durch synthetische Urethane, welche dem Eserin nach dessen Strukturauflösung¹⁰⁾ nachgebaut wurden zuerst von *E. Stedman*¹¹⁾ im Institut von *G. Barger* und dann insbesondere in den Laboratorien der Fa. *Hoffmann-La Roche*¹²⁾ 13) 14); bei diesen synthetischen Urethanen erwiesen sich cholinesterasen-

*) Aus der Dissertation *R. Straller*, Universität Erlangen 1957.

1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 82, 51, 81, 205 (1918).

2) Biochem. Z. 92, 347 (1918).

3) Biochem. Z. 92, 355 (1918).

4) *H. Fühner* und *E. Mertens*, Biochem. Z. 115, 262 (1921).

5) Zusammenfassung: *H. Fühner*, Nachweis von Giften auf pharmakologischem Wege, in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7, S. 421 ff., insbesondere S. 463—470, Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien 1934.

6) *B. Minz*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 167, 85 (1932) und 168, 292 (1932).

7) *H. H. Dale* und *H. Feldberg*, J. Physiol. 82, 123 (1934).

8) *O. Loewi* und *E. Navratil*, Pflügers Arch. ges. Physiol. 214, 689 (1926); *E. Engelhardt* und *O. Loewi*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 150, 1 (1930).

9) *E. und E. Stedman* und *L. H. Easson*, Biochem. J. 26, 2056 (1932).

10) *E. Stedman* und *G. Barger*, J. chem. Soc. [London] 127, 247 (1925).

11) Biochem. J. 20, 719 (1926) und 23, 17 (1929); J. chem. Soc. [London] 1929, 609 und 1931, 1126.

12) *J. A. Aeschlimann* und *M. Reinert*, J. Pharmacol. Exper. Therap. 43, 413 (1931).

13) *J. A. Aeschlimann* und *A. Stempel*, Festschr. Emil Barell 1946, S. 306, Basel.

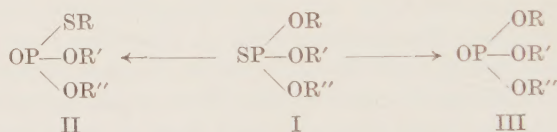
14) *G. Lehmann*, Festschr. Emil Barell 1946, S. 314, Basel.



hemmende Eigenschaften und eserinähnliche, pharmakologische Eigenschaften als untrennbar miteinander verknüpft¹⁵⁾.

Inzwischen sind in allen Lebewesen mit Nerven Cholinesterasen verschiedener Art aufgefunden worden, die man eingeteilt hat nach ihrer Aktivität gegenüber kleinen und großen Konzentrationen von Acetylcholin oder nach ihrer Aktivität gegenüber verschiedenartigen Estern oder nach ihrer Hemmbarkeit durch verschiedene, synthetische Hemmstoffe¹⁶⁾. Außerdem sind zu den cholinesterasenhemmenden Urethanen mit ihrer Verwendung als Arzneimittel¹⁵⁾ und als Insektizide¹⁷⁾ die cholinesterasenhemmenden Phosphorverbindungen mit wesentlich stärker hemmenden Vertretern gekommen, welche ausgehend von den überraschend toxischen Estern der Monofluorophosphorsäure¹⁸⁾ weiterentwickelt worden sind einerseits als Insektizide von *G. Schrader*¹⁹⁾ und andererseits als Kampfstoffe²⁰⁾.

Als Insektizide haben Ester der Thiophosphorsäure I (Thion-Form) eine hervorragende Bedeutung erlangt, welche Cholinesterasen *in vitro* beim Fermentversuch nicht oder kaum hemmen; beim Erhitzen lagern sie sich teilweise in Ester der Thiol-Form II um, welche Cholinesterasen stärker hemmen und toxischer sind; *in vivo* werden die Ester der Thion-Form I in die besonders stark cholinesterasenhemmenden und toxischen Ester der Phosphorsäure (III) umgewandelt¹⁷⁾:



So lagert sich z. B. das nicht cholinesterasehemmende O.O-Diäthyl-O-(p-nitro-phenyl)-thiophosphat (I: R,R' = C₂H₅; R'' = p-C₆H₄ · NO₂) (E 605, E. W.) bereits bei 130° merklich¹⁷⁾ um in das stark cholinesterasehemmende²¹⁾ O.S-Diäthyl-O-(p-nitro-phenyl)-thiophosphat (II: R,R' = C₂H₅; R'' = p-C₆H₄ · NO₂) und *in vivo* wird es verwandelt in das hochwirksame Diäthyl-p-nitro-phenylphosphat (III: R,R' = C₂H₅; R'' = p-C₆H₄ · NO₂) (E 600, Mintacol, E. W.)^{22) 23) 24)}.

¹⁵⁾ Zusammenfassung: *A. Stempel* und *J. A. Aeschlimann*, *Synthetic Analogs of Physostigmine*, in *F. F. Blicke* und *R. H. Cox*, *Medicinal Chemistry*, Vol. III, S. 238—339, J. Wiley, New York 1956.

¹⁶⁾ Zusammenfassung von *K.-B. Augustinsson*, *Acetylcholine Esterase and Cholinesterase* in *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, *The Enzymes*, I/1, S. 443, Academic Press, New York 1950.

¹⁷⁾ *R. L. Metcalf*, *Organic Insecticides, Their Chemistry and Mode of Action*, Interscience Publishers, New York 1955.

¹⁸⁾ *W. Lange* und *G. v. Krueger*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1598 (1932).

¹⁹⁾ *G. Schrader*, *Die Entwicklung neuer Insektizide auf der Grundlage organ. Fluor- und Phosphor-Verbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1951.

²⁰⁾ *M. F. Sartori*, *New Developments in the Chemistry of War Gases*, *Chem. Rev.* **48**, 225 (1951).

²¹⁾ *W. M. Diggie* und *J. C. Gage*, *Biochem. J.* **49**, 491 (1951).

²²⁾ *J. C. Gage*, *Biochem. J.* **54**, 426 (1953).

²³⁾ *F. Duspiva*, *Angew. Chem.* **66**, 541 (1954).

²⁴⁾ *A. N. Davison*, *Biochem. J.* **61**, 203 (1955).

Diese oxydative Entschwefelung gelingt auch *in vitro* durch Behandlung mit Salpetersäure²⁵⁾.

Ein Nachweis²⁶⁾ des toxikologisch vielbeachteten E 605, E. W., kann sich demnach gründen entweder auf den Nachweis des p-Nitro-phenols²⁷⁾ oder auf den Nachweis des Phosphors²⁸⁾ oder auf den Nachweis der Giftigkeit bei den verschiedenartigsten kleinen Versuchstieren²⁶⁾ oder schließlich auf den Nachweis der Cholinesterasenhemmung nach der Oxydation zu E 600²⁵⁾.

Als weitere allgemeine Nachweismöglichkeit von cholinesterasenhemmenden Verbindungen haben wir die Sensibilisierung des Blutegelrückenmuskels gegenüber Acetylcholin wieder aufgegriffen. Wir haben außerdem die Toxizität von Insektiziden und Arzneimitteln beim ganzen Blutegel geprüft, welcher ja in Apotheken leicht beschafft werden kann für diesen Zweck.

Sensibilisierung des Blutegelrückenmuskels und Toxizität für den ganzen Blutegel

Zugrunde gelegt wurde den Sensibilisierungsversuchen die Kontraktion, welche Blutegelrückenmuskelstücke nach einem Aufenthalt von 20 Min. in einem Bad mit 5–10 γ Eserin/10 ccm bei Zugabe von 1 γ Acetylcholin aufwiesen. Die Substanzmengen, die bei Parallelversuchen dieselbe Kontraktion verursachten, finden sich in Tab. 1 und nähere Versuchsangaben bei der Beschreibung der Versuche. Acetylcholin wurde mit 1 γ /10 ccm absichtlich niedrig dosiert, damit die Möglichkeit einer Kontraktion ohne Sensibilisierung allein durch Acetylcholin ausgeschlossen blieb. Die gewählte Konzentration betrug 1/100 der von *H. Fühner*²⁾ 5) zum Nachweis von Eserin angewandten Konzentrationen von 400 γ Acetylcholin/40 ccm und stellte weniger als $\frac{1}{100}$ der Menge dar, bei welcher wir je ohne Sensibilisierung eine vergleichbare Kontraktion beobachten konnten, wofür im allgemeinen 500–1000 γ Acetylcholin/10 ccm erforderlich waren. Die Empfindlichkeit der Muskelstücke wechselte; sie hing insbesondere von der Herkunft der Egel ab, außerdem verringerte sie sich stets etwas im Laufe des Winters. Deshalb sind in der Tab. 1 Grenzwerte aus einigen Versuchen angeführt. In der Spalte daneben finden sich jene Substanzmengen, welche erforderlich waren, wenn man diese Substanzmengen vor der Prüfung mit Salpetersäure²⁵⁾ behandelte, wie bei der Beschreibung der Versuche vermerkt ist.

Bei der orientierenden Toxizitätsprüfung wurde in Versuchsreihen mit 1, 5, 50, 500, 5000 γ Substanz/50 ccm Badflüssigkeit ermittelt, welche Menge nach 24 Stdn. einen Blutegel tötete vor und nach der Behandlung mit Salpetersäure.

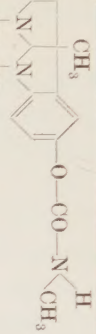
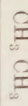
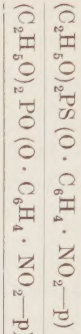
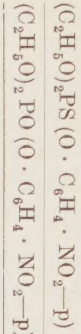
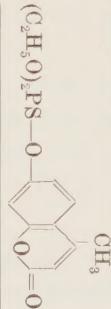
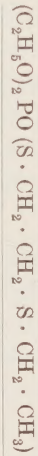
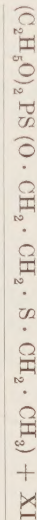
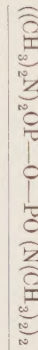
²⁵⁾ *P. A. Giang* und *S. A. Hall*, *Anal. Chem.* 23, 1830 (1951).

²⁶⁾ Umfangreiche Literaturangaben bei *H. Kaiser* und *Th. Haag*, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges.* 289, 542 (1956).

²⁷⁾ *P. E. Averell* und *M. V. Norris*, *Anal. tic. Chem.* 20, 753 (1948).

²⁸⁾ *F. T. Eggertsen* und *F. T. Weiss*, *Anal. tic. Chem.* 29, 453 (1957).

Tabelle 1. Sensibilisierung von Blutegelrückenmuskel und Toxizität für ganze Blutegel

Substanz	Nr.	Kontraktion des Blutegelrückenmuskels mit 1 γ Acetylcholin nach Sensibilisierung mit			Für ganzen Blutegel in 50 cem Bad flüssigkeit tödliche Menge	Substanz in γ nach Behandlung mit HNO ₃
		Substanz in γ	Substanz in γ nach Behandlung mit HNO ₃	Substanz in γ		
	IV	5—10		500		
	V	5—10		» 5000		
	VI	500—1000				
	VII	50—100				
	VIII	> 500	5—10	500		5
	IX	5—10		5		
	X	200	10—50	500		50
	XI	10—50	10—50	500		500
	XII	50—100	50—100	5000		5000
	XIII	10—50	10—50	500		500
	XIV	» 1000	» 1000	» 5000		
	XV	5—10		» 5000		

Bei den Urethanen sensibilisiert der Dimethylcarbamidsäureester des (m-Hydroxy-phenyl)-trimethyl-ammonium-ions (Prostigmin, E. W.) (V)^{12) 15)} ebenso gut wie Eserin (IV) und rund 100mal besser als der (p-Chlor-phenyl)-methyl-carbamidsäureester des (m-Hydroxy-phenyl)-trimethyl-ammonium-ions (Nu 1250¹³⁾, Ro 2-1250¹⁵⁾) (VI)²⁹⁾ sowie rund 10mal besser als der Dimethylcarbamidsäureester des (2-Hydroxy-5-phenyl-benzyl)-trimethyl-ammonium-ions (Nu 683¹⁴⁾, Ro 2-0683¹⁵⁾) (VII)²⁹⁾. Auf den ganzen Blutegel wirkt nur Eserin (IV) als lipophiles, ausreichend resorbierbares tertiäres Amin, während die hydrophile, quartäre Ammonium-Verbindung Prostigmin, E. W., (V) nicht genügend resorbiert wird. Vermutlich werden auch die von der Fa. *J. R. Geigy* neuerdings entwickelten insektiziden Urethane¹⁷⁾ für den Blutegel stark toxisch sein.

Beiden Phosphorverbindungen sensibilisieren nicht die nichtcholinesterasenhemmenden Thiophosphorsäureester in der Thion-Form VIII (E 605, E. W.³⁰⁾) und X (Potasan, E. W.³⁰⁾). Deutlich sensibilisiert jedoch der stark cholinesterasenhemmende¹⁷⁾ Ester in der Thiol-Form XI (Isosystox³⁰⁾), auf welchen die sensibilisierende Wirkung des Gemisches XII (Systox, E. W.³⁰⁾) zurückgeht. Dieselbe Sensibilisierung wird mit dem Präparat XIII (Bladafum, E. W.³⁰⁾) erzielt, was für ein reines Anhydrid einer Thion-Form auffällig wäre.

Als gänzlich unwirksam erweist sich die nichtcholinesterasenhemmende Verbindung XIV, das in den Pflanzen sich verteilende System-Insektizid Schradan³⁰⁾, welches in vivo umgewandelt werden kann in eine cholinesterasenhemmende Verbindung, die auch nach Oxydation in vitro^{31) 32)} entstehen soll¹⁷⁾. Durch die Behandlung mit Salpetersäure²⁵⁾ erhielten wir ebensowenig ein sensibilisierendes Umwandlungsprodukt wie durch Behandlung mit Kaliumpermanganat^{31) 32)} oder Chlor³¹⁾. Desgleichen lieferte weder Bladafum (XIII) mit Salpetersäure ein wirksames Reaktionsprodukt noch die Thion-Form in Systox (XII), welche der Literatur nach auch nicht mit Bromwasser³³⁾, wohl aber mit N-Brom-succinimid³⁴⁾ aktiviert worden ist. Dagegen verwandelt die Behandlung mit Salpetersäure Potasan (X) in ein stark sensibilisierendes und für den ganzen Blutegel recht toxisches Reaktionsprodukt. Besonders eindrucksvoll ist die oxydative Entschwefelung durch Salpetersäure²⁵⁾ von E 605 (VIII) zu dem über 100mal stärker sensibilisierenden E 600 (Mintacol, E. W. (IX)³⁰⁾), welches einen ganzen Blutegel noch in einer Verdünnung 1 : 10000000 abtötet.

Diese einfache Möglichkeit, mit dem ganzen Blutegel noch 5 γ E 605 (VIII) nachweisen zu können, führte dazu, daß wir noch eine Reihe weiterer, verschieden-

²⁹⁾ Für die entgegenkommende Überlassung der Substanzprobe danken wir Herrn Dr. *J. A. Aeschlimann*, Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, N. J.

³⁰⁾ Für die entgegenkommende Überlassung der Substanzprobe danken wir Herrn Dr. *G. Schrader*, Farbenfabriken Bayer A. G., Elberfeld.

³¹⁾ *E. Y. Spencer* und *R. D. O'Brien*, *J. Agric. Food Chemistry* **1**, 716 (1953); **3**, 56 (1955); **5**, 123 (1957).

³²⁾ *J. E. Casida* und *M. A. Stahman*, *J. Agric. Food Chemistry* **1**, 883 (1953) und **3**, 922 (1955).

³³⁾ *H. O. Fallscheer* und *J. W. Cook*, *J. Assoc. off. agric. Chemists* **39**, 691 (1956).

³⁴⁾ *J. W. Cook*, ebenda **38**, 826 (1955).

artiger Insektizide und Arzneimittel auf die Toxizität am ganzen Blutegel prüften vor und nach der Behandlung mit Salpetersäure (Tab. 2).

Tabelle 2

Für ganze Blutegel in 50 cem Badeflüssigkeit tödliche Mengen in γ vor (A) und nach (B) der Behandlung mit Salpetersäure

	A	B
Chrysanthemummonocarbonsäureäthylester*)	5000	
Chrysanthemummonocarbonsäureester des 2-Allyl-4-hydroxy-3-methyl-cyclopenten-(2)-on-(1) (Allethrin, E. W.)*)	50—500	50—100
γ -Hexachlor-cyclohexan	500	500
Rotenon	500	≥ 500
Nicotin	500	≥ 500
Veratrin, DAB 6	500	> 5000
Apomorphin	500	
Strychnin	5000	
Morphin	> 5000	
Aconitin, crist., Erg. B. 6	> 5000	
Picrotoxin	> 5000	
5,5-Diäthyl-barbitursäure	> 5000	

*) Für die entgegenkommende Überlassung der Substanzprobe danken wir der Food Machinery and Chemical Corporation, Fairfield Chemical Division, Baltimore, MD., USA.

Keine der in Tab. 2 aufgeführten Verbindungen wird durch die Behandlung mit Salpetersäure in ein toxischeres Reaktionsprodukt verwandelt, wie es so ausgeprägt für die Ester der Thiophosphorsäure in der Thion-Form, Potasan (X) und E 605 (VIII), der Fall ist. Dieses typische Verhalten erscheint somit zum toxikologischen Nachweis von intakten, nichthydrolysierten Insektiziden vom Typ des E 605 und Potasan geeignet, wobei in willkommener Weise auch rohe, gefärbte Organextrakte der Behandlung mit Salpetersäure²⁵⁾ oder mit Bromwasser³³⁾ und der anschließenden Prüfung am Blutegel zugänglich sein dürften.

Sofern die Sensibilisierung des Blutegelrückenmuskels zum toxikologischen Nachweis von Insektiziden oder Arzneimitteln herangezogen werden soll, ist darauf zu achten, daß zwar spezifisch cholinesterasenhemmende Verbindungen bisher ausnahmslos sensibilisierend wirkten, daß aber nicht umgekehrt jede sensibilisierende Verbindung auch cholinesterasenhemmend sein muß, wie das Dihydrooxycodionon (Eukodal, E. W.) (XV) beweist (Tab. 1). Dieses sensibilisiert auf unbekannte Weise ebenso gut wie Eserin³⁵⁾, ohne die Cholinesterase des menschlichen Blutserums nennenswert zu hemmen³⁶⁾.

Cholinesterasen-Aktivität des Blutegelrückenmuskels

Daß bei der Sensibilisierung des Blutegelrückenmuskels durch cholinesterasenhemmende Verbindungen die Hemmung einer Cholinesterase-Aktivität vom Typ

³⁵⁾ P. Dodel, G. Dastugue und A. Bresson, Compt. rend. soc. biol. 132, 267 (1939) und 133, 429 (1940).

³⁶⁾ G. Dastugue und M. Gandour, Compt. rend. soc. biol. 133, 595 (1940).

der menschlichen Serumcholinesterase eine Hauptrolle spielt, deutet die Sensibilisierung mit Nu 683 (VII) an, einem Hemmstoff der Serumcholinesterase³⁷⁾, welcher etwa 10mal besser sensibilisiert, Tab. 1, als Nu 1250 (VI), ein Hemmstoff des anderen Cholinesterase-Typs in menschlichen Erythrocyten und in Nervengeweben^{37) 16)}.

Damit stimmt überein, daß ein Extrakt von Blutegelemuskeln Benzoylcholin, ein Substrat der menschlichen Serumcholinesterase^{38) 16)}, wesentlich schneller hydrolysiert als Acetyl- β -methyl-cholin^{39) 16)} (Mecholyl, E. W.), ein Substrat der Cholinesterase in Nervengeweben³⁹⁾. Mit den bisherigen Versuchen läßt sich jedoch noch nicht sicher entscheiden, ob die festgestellte Cholinesterasen-Aktivität des Blutegelel Rückenmuskels auf eine einzige Cholinesterase zurückgeht oder eher auf zwei verschiedene, wobei man sich vorstellen könnte, daß die Acetyl- β -methyl-cholin-spaltende Cholinesterase im Nervengewebe lokalisiert sei.

Verständlicherweise zeigten sich auch bei der Kontraktion des normalen und sensibilisierten Blutegelel Rückenmuskels deutliche Unterschiede mit verschiedenen Estern: Am normalen Muskel wurden im 10 ccm Bad 0,1—0,5 mg Acetylcholin benötigt, während vergleichsweise von Benzoylcholin 5—10 mg und von Acetyl- β -methyl-cholin über 10 mg erforderlich waren; am sensibilisierten Muskel wurden bei den gewählten Versuchsbedingungen der Tab. 1 im 10 ccm Bad 1 γ Acetylcholin benötigt, während von Benzoylcholin 100—500 γ und von Acetyl- β -methyl-cholin 1000—5000 γ erforderlich waren. Dieses Wirkungsverhältnis am sensibilisierten Muskel, Acetylcholin : Benzoylcholin : Acetyl- β -methyl-cholin = 1 : $\sim 1/100$: $\sim 1/1000$, blieb etwa dasselbe, ganz gleichgültig, ob mit Eserin, Prostigmin (V), Nu 1250 (VI), Nu 683 (VII), E 600 (IX), XI, XII, XIII oder Eukodal (XV) sensibilisiert worden war.

Der von Cholinesterasen nur sehr langsam gespaltene Carbamidsäureester des Cholins (Doryl, E. W.) vermochte den normalen Blutegelel Rückenmuskel bereits ab 1 γ /10 ccm Bad zu kontrahieren und wirkte also auch hier etwa 100mal stärker als Acetylcholin.

Frau *H. Nitsche-Blank* danken wir herzlich für ihre Hilfe bei den Versuchen.

Beschreibung der Versuche

Blutegel: Für die Sensibilisierungsversuche haben wir große, 3—5 g schwere medizin. Blutegel verwandt, für die Toxizitätsversuche kleine, 0,5—1 g schwere. Bevorzugt wurden Tiere aus einer deutschen Zucht wegen der gleichmäßigeren Empfindlichkeit der Rückenmuskel gegen Acetylcholin. Gelegentlich sank die Empfindlichkeit der gelieferten Tiere stark ab. In einem solchen Falle haben wir die Tiere der aus der pharmazeutischen Fachpresse ersichtlichen Züchtereien durchprobiert und eine neue, befriedigende Bezugsquelle ausgewählt.

Sensibilisierungsversuche: Ein Stück von etwa 15—20 Gliedern des nach *H. Fühner*^{1) 5)} präparierten, längshalbierten⁷⁾ Rückenmuskels befand sich an einem 1 : 10 vergrößerten Hebel mit einem Gegengewicht von etwa 2 g in einem zylindrischen Bad, $\varnothing$ 1,5 cm, von 10 ccm Inhalt, durch welches Sauerstoff perlte, und welches mit Zu- und

³⁷⁾ *R. D. Hawkins* und *B. Mendel*, *Biochem. J.* 44, 260 (1949).

³⁸⁾ *B. Mendel* und *H. Rudney*, *Biochem. J.* 37, 59 und 473 (1943).

³⁹⁾ *M. Guggenheim*, *Die biogenen Amine*, 4. Aufl., Karger, Basel 1951.

Ableitung versehen war. Registriert wurde fortlaufend mit einem Kymographion, welches in einer Stunde 4 cm lief. Während des anfänglichen, 20–40 Min. beanspruchenden Erschlaffens wurde öfters mit Badflüssigkeit gespült. Für 1 Liter dieser *Ringer-Quastel-Lösung*⁴⁰⁾ wurden 32 ccm einer 1%igen KCl-Lösung, 18 ccm einer 1%igen Lösung von $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 71 ccm einer 10%igen NaCl-Lösung, 0,12 g NaHCO_3 und 0,77 g Traubenzucker DAB 6 verwandt. Nach dem Erschlaffen wurde die Badflüssigkeit abgelassen und sofort ersetzt durch 10 ccm einer frischbereiteten Lösung, welche die zu prüfende Substanzmenge in 10 ccm Badflüssigkeit enthielt. Nach 20 Min. Einwirkungszeit kamen 0,5 ccm einer Acetylcholin-Lösung mit einem Gehalt von 1 γ /0,5 ccm hinzu. Dieses Gemisch wirkte 3 Min. lang ein, bevor mehrmals mit Badflüssigkeit gespült wurde. War kein etwa 1 cm hoher Ausschlag erfolgt, wie mit 5–10 γ Eserin, dann wurde in orientierenden Versuchen mit einer größeren Substanzmenge die Sensibilisierung wiederholt, wobei die Abstufungen 5, 50, 500 γ Substanz sich als zweckmäßig erwiesen.

Die Acetylcholin-Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch bereitete durch fünf-faches Verdünnen mit Badflüssigkeit einer im Eisschrank mehrere Wochen haltbaren Stammlösung⁴⁰⁾ von 10 γ Acetylcholinchlorid 1 ccm in 5%iger NaH_2PO_4 -Lösung, pH 4,8.

Behandlung mit Salpetersäure²⁵⁾: Von den lipoidlöslichen Substanzen wurden Stammlösungen hergestellt in Äther oder Chloroform und Verdünnungen, welche die gewünschten Mengen in 0,5 bis 1,0 ccm enthielten. — In einem über 30 ccm fassenden Reagenzglas mit seitlichem Ansatz wurden 0,5 bis 1 ccm einer solchen Verdünnung unter dem verminderten Druck einer Wasserstrahlpumpe eingedampft. In das mit Eiswasser 2-kühlte Reagenzglas gab man vorsichtig unter gelindem Umschwenken 5 ccm Salpetersäure-Reagenz, bestehend aus gleichen Volumenteilen konz. Salpetersäure, d 1,42, und wasserfreier Salpetersäure, d 1,52, und ließ das Gemisch 5 Min. an der Luft stehen. Hierauf gab man 25 ccm eiskaltes Wasser zu und entleerte das Reagenzglas in einen $\frac{1}{4}$ Liter Scheidetrichter, worauf es noch zweimal mit etwas Wasser und mit je 25 ccm Äther nachgespült wurde. Nach dem Umschütteln trennte man die ätherische Schicht ab und entzog ihr die Säure durch Schütteln mit 10 ccm Portionen gesättigter NaHCO_3 -Lösung. Abschließend wurde die Ätherschicht durch zweimaliges Schütteln mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen. Diese durch Gießen durch etwas Verbandsmull geklärte Ätherschicht wurde an der Wasserstrahlpumpe im Reagenzglas mit seitlichem Ansatz eingedampft ohne Erwärmung. Den Rückstand nahm man unmittelbar vor der Prüfung in gemessenen Mengen Badflüssigkeit auf oder, wenn weiterverdünnt werden mußte, in Wasser bzw. in Äthanol, sofern der Rückstand wasserunlöslich war. Ein Gehalt von 2% Äthanol in der Badflüssigkeit beeinflusste die Sensibilisierung nicht.

Toxizitätsversuche: Im 100-ccm-Erlenmeyer-Kolben, der mit einem Drahtgitter verschlossen wurde, beließ man je einen kleinen, 0,5 bis 1 g schweren Blutegel 24 Stdn. lang in 50 ccm wäßriger Verdünnung der Substanz. Geprüft wurde mit 1, 5, 50, 500, 5000 γ Substanz, soweit die Löslichkeit es zuließ. Als Lösungsvermittler bewährte sich P_6 , $\text{HO}(\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{O})_6\text{H}^{11)$, welches in Konzentrationen bis 2% keinen Einfluß ausübte.

Mit hohen Dosen starkwirksamer Verbindungen rollten sich die Blutegel alsbald zusammen und verendeten. Bei lipoidlöslichen Substanzen mit guter Wasserlöslichkeit, welche schnell resorbiert werden, erfolgte dies in Sekunden beim Eserin erst in Minuten. Mit weniger überhöhten Dosen beobachtete man gelegentlich zunächst ein Erregungsstadium.

Cholinesterasen-Aktivität im Muskelextrakt⁴²⁾: 1 g frischpräparierte Blutegel-rückenmuskeln wurden klein zerschnitten und im eiskühlten Mörser mit 1 g gereinigtem

⁴⁰⁾ J. H. Quastel, M. Tennenbaum und A. H. M. Wheatley, Biochem. J. 30, 1668 (1936).

⁴¹⁾ Für die freundliche Überlassung von reinem, fraktioniertem P_6 danken wir bestens Herrn Dr. C. Schöller, B.A.S.F., Ludwigshafen.

⁴²⁾ W. Riechert und Th. Wieland, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 197, 629 (1941).

Seesand in 5 ccm Phosphatpufferlösung, p_H 7,21 (16,72 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ und 2,72 g KH_2PO_4 im Liter) während 2 Std. zerrieben. Der Brei wurde zentrifugiert und 1 ccm der überstehenden Flüssigkeit mit Phosphatpufferlösung auf 25 ccm Extrakt verdünnt. 0,5 ccm Extrakt entsprachen 4 mg Muskel und enthielten der Biuretreaktion⁴³⁾ nach bei verschiedenen Zubereitungen 0,13 bis 0,33 mg Protein. Zur colorimetrischen Cholinesterasen-Bestimmung mit der Hydroxamsäure-Reaktion nach *Hestrin* in der Ausführung nach *J. W. Cook*⁴⁴⁾ wurden je Ansatz 0,5 ccm Extrakt mit Substratmengen von 100, 200, 400 γ 30 Min. lang inkubiert, wobei folgende Spaltungen in % als Mittel aus mehreren Versuchen beobachtet wurden:

Substrat	100 γ	200 γ	400 γ
Acetylcholin	83%	77%	60%
Benzoylcholin	68%	56%	33%
Acetyl- β -methyl-cholin	26%	24%	15%

⁴³⁾ *A. G. Gornall, C. I. Bardawill und M. M. David*, J. Biol. Chem. 177, 751 (1949) (mit Humanserum als Standard).

⁴⁴⁾ *J. Assoc. off. agric. Chemists* 37, 561 (1954).

Anschrift: Prof. Dr. O. Dann, Institut für angewandte Chemie der Universität Erlangen.

LEBENS LAUF

Als Tochter des Apothekers Hanns Straller und seiner Ehefrau Philomena, geb. Renner, wurde ich am 30. Oktober 1929 in Nürnberg geboren. Von 1936-1940 besuchte ich die Nürnberger Volksschule, 1940-1945 die Mädchenoberschule Labenwolf in Nürnberg und von 1946-1948 die Mädchenoberrealschule Fürth i. B., an der ich eine Klasse aufholte und im Juni 1948 die Reifeprüfung bestand.

Am 20. Oktober 1948 trat ich als Praktikantin in die Apotheke des Städtischen Krankenhauses Nürnberg ein. Mein zweites Praktikantenjahr verbrachte ich bei Herrn Apotheker Rechenmacher in der Königstorapotheke Nürnberg. Im September 1950 legte ich mein Vorexamen in Nürnberg ab und studierte von November 1950 an der Universität Erlangen, wo ich im August 1953 mein pharmazeutisches Staatsexamen bestand. Seit Oktober 1953 arbeitete ich im Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen an meiner Dissertation.

